

国产盐酸二甲双胍片与国际公认参比制剂溶出度比较

孙黎, 姚晓东, 王玉洪, 金冠钦, 夏玲红(上海交通大学医学院附属仁济医院临床药理实验室, 上海 200001)

摘要: 目的 建立盐酸二甲双胍片溶出度测定方法, 并分别比较 250 mg 及 500 mg 2 种规格国产盐酸二甲双胍片与国际公认参比制剂的溶出曲线。方法 分别以水、0.1 mol·L⁻¹ 盐酸、pH 4.0 及 pH 6.8 磷酸盐缓冲溶液为溶出介质, 采用桨法进行体外溶出度试验。用高效液相-紫外分光光度法(HPLC-UV)测定溶出介质中药物含量, 并采用溶出度相似因子(f_2 值)分别评价国产片(每片 250 mg)与日本橙皮书 Glycoran(每片 250 mg)、国产片(每片 500 mg)与欧盟上市 Merck Santé S.A.S(每片 500 mg)在各 pH 介质中的相似性。结果 每片 250 mg 的 2 种制剂在各溶出介质中, 15 min 内的溶出百分率均>85%。在 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸的溶出介质中, 国产盐酸二甲双胍片(每片 500 mg)与欧盟上市 Merck Santé S.A.S(每片 500 mg)的溶出曲线 f_2 值为 78.5(>50); 在水、pH 4.0 及 pH 6.8 磷酸盐缓冲溶液的溶出介质中, 2 种制剂的溶出曲线 f_2 值均<50。结论 2 种规格为每片 250 mg 的盐酸二甲双胍片溶出行为相似。除 0.1 mol·L⁻¹ 的盐酸介质外, 2 种规格为每片 500 mg 的盐酸二甲双胍片在各种溶出介质中的溶出行为不相似。

关键词: 盐酸二甲双胍; 体外溶出; 相似因子; 国际公认参比制剂

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)05-0577-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.05.012

引用本文: 孙黎, 姚晓东, 王玉洪, 等. 国产盐酸二甲双胍片与国际公认参比制剂溶出度比较[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(5): 577-581.

Dissolution Comparison Between Domestic Metformin Hydrochloride Tablets and the Internationally Recognized Reference Products

SUN Li, YAO Xiaodong, WANG Yuhong, JIN Guanqin, XIA Linghong(Department of Clinical Pharmacology Laboratory, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the method of dissolution determination and compare the dissolution profiles of the two specifications of domestic metformin hydrochlorid(250 mg and 500 mg) with those of the internationally recognized reference products, respectively. **METHODS** The *in vitro* dissolution profiles of metformin hydrochlorid tablets were tested by paddle dissolving method with the dissolution media of water, 0.1 mol·L⁻¹ hydrochloric acid, phosphate buffer saline(PBS) of pH 4.0 and pH 6.8. Metformin hydrochlorid in the dissolution media was determined by HPLC-UV. The dissolution similarity factors(f_2) was used to evaluate the similarity of dissolution profiles between domestic tablets(250 mg per tablet) and Glycoran(250 mg per tablet) in JP-orangebook, domestic tablets(500 mg per tablet) and Merck Santé S.A.S(500 mg per tablet) received marketing approval in Europe, respectively. **RESULTS** The accumulative dissolution percentages of domestic and reference products(250 mg per tablet) were both >85% at 15 min. In the dissolution medium of 0.1 mol·L⁻¹ hydrochloric acid, the dissolution similarity factor f_2 of domestic metformin hydrochlorid tablets(500 mg per tablet) compared with Merck Santé S.A.S was 78.5(>50). In the other dissolution media(water, PBS of pH 4.0 and pH 6.8), the f_2 of test and reference products (500 mg per tablet) was <50. **CONCLUSION** The dissolution profile of domestic products(250 mg per tablet) is similar with reference produces. There is a significant different dissolution profile between domestic(500 mg per tablet) and reference products in various dissolution media, except in 0.1 mol·L⁻¹ hydrochloric acid.

KEYWORDS: metformin hydrochlorid; *in vitro* dissolution; similarity factor; internationally recognized reference products

盐酸二甲双胍(C₄H₁₂ClN₅)是治疗 II 型糖尿病一线药物, 最早于 1958 年在英国上市, FDA 于 1994 年 12 月批准施贵宝公司生产的 Glucophage 在美国上市。我国自 2002 年后开始有二甲双胍仿

制药上市, 但多以施贵宝公司在我国的本地化产品——格华止®为参比制剂, 溶出度考察多采用 1 种溶出介质——水或 pH 6.8 缓冲液^[1]。显然已经不能符合国家药品监督管理局于 2015 年发布的

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目(17411964500)

作者简介: 孙黎, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: (021)53882129

E-mail: yxds1-1@163.com

《普通口服固体制剂参比制剂选择和确定指导原则(2015)》^[2]以及 2017 发布的《仿制药品参比制剂目录》^[3]要求。

本次溶出度试验以国产盐酸二甲双胍片(规格: 每片 250, 500 mg)为试验制剂; 参比制剂的选择按国家药品监督管理局发布的《仿制药参比制剂目录》, 250 mg 的盐酸二甲双胍片的参比制剂为日本橙皮书 Glycoran®(NIPPON SHINYAKU Co., Ltd); 500 mg 的盐酸二甲双胍的参比制剂为欧盟上市的 Glucophage®(Merck Santé S.A.S)。建立 HPLC 测定溶出介质中的药物含量, 采用浆法分别考察各制剂在水、0.1 mol·L⁻¹ 盐酸、pH 4.0 及 pH 6.8 磷酸盐缓冲溶液 4 种溶出介质中的溶出行为, 并利用相似度因子分别比较 2 种试验制剂与相应参比制剂的溶出曲线^[4]。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 1525 高效液相色谱仪, Waters 2487 紫外检测器, Waters breeze 色谱工作站(美国 Waters 公司); Mettler-AE240 双量程分析天平(瑞士梅特勒托利多公司); RC806D 智能溶出试验仪(天津市天大天发科技有限公司)。

1.2 试剂

盐酸二甲双胍对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100664-201604; 规格: 100 mg; 含量: 100%, 以 C₄H₁₁N₅·HCl 计, 分子量为 165.63); 乙腈(德国 MERCK 公司, 批号: 15090531)、磷酸(美国 TIDEA 公司, 批号: 101026)、庚烷磺酸钠(日本东京华成工业株式会社, 批号: 10345)均为色谱纯; 水为重蒸水; 其他试剂均为分析纯。

1.3 研究用药

试验制剂: 国产盐酸二甲双胍片(上海信谊天平药业有限公司, 批号: 20170401; 规格: 每片 250 mg; 批号: 20171121; 规格: 每片 500 mg)。

参比制剂: Glycoran(日本新药株式会社, 批号: 358201; 规格: 每片 250 mg); Glucophage(Merck Santé S.A.S, 批号: HL0190; 规格: 每片 500 mg)。

2 溶出度测定方法

2.1 色谱条件

色谱柱: XBridge™ C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 保护柱: XBridge™ C₁₈(4.6 mm×20 mm,

3.5 μm); 流动相: 0.05%庚烷磺酸钠溶液(用 1%磷酸溶液调节 pH 为 4.0): 乙腈=78:22; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 233 nm; 进样量: 20 μL; 运行时间: 7 min。

2.2 溶出度测定方法

取样品 6 片, 按中国药典 2015 年版四部附录 0931 第二法(浆法)^[5], 900 mL 体系, 转速为 75 r·min⁻¹, 温度(37±0.5)°C, 依法操作, 分别于 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 45, 60, 75, 90 min 取溶液约 1 mL, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 精密吸取 50 μL 续滤液, 精密加入 950 μL 的流动相溶液, 涡旋混合 5 s, 作为供试液。

3 方法与结果

3.1 药物测定方法验证

试验制剂由上海信谊天平药业有限公司进行方法学验证, 符合中国药典 2015 年版盐酸二甲双胍片项下含量测定方法^[6]。现对 2 种参比制剂是否符合中国药典 2015 年版该药物项下的含量测定方法进行验证。

3.1.1 专属性考察 盐酸二甲双胍的保留时间为 5.2 min 左右, 峰形良好, 各辅料对盐酸二甲双胍的测定无干扰, 见图 1。

3.1.2 线性关系考察 精密称取盐酸二甲双胍对照品, 加流动相制成 1 mg·mL⁻¹ 的储备液。继续稀释成不同浓度的盐酸二甲双胍对照品溶液(1.60, 3.20, 6.41, 12.8, 25.6 和 51.3 μg·mL⁻¹), 各 20 μL, 注入高效液相色谱仪, 测定盐酸二甲双胍峰面积。以峰面积(A)对浓度(C)进行线性回归, 求得回归方程: $A=9.41 \times 10^{-6}C+0.376(r=0.9999)$ 。结果表明, 盐酸二甲双胍浓度在 1.60~51.3 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好。

3.1.3 回收率考察 精密称取不同量的盐酸二甲双胍对照品, 并精密加入参比制剂细粉, 用磷酸缓冲液 (pH=6.8) 配制成不同浓度的溶液, 过滤。取续滤液 50 μL, 加入 950 μL 的流动相溶液稀释。取稀释液 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 每个浓度平行操作 3 份, 计算加样回收率。结果见表 1, 参比制剂 250 mg 规格高、中、低 3 个浓度的加样回收率为(100.9±2.43)%, (98.4±2.03)%, (102.9±2.11)%; 500 mg 规格高、中、低 3 个浓度的加样回收率为(101.5±1.66)%, (102.0±1.97)%, (99.1±1.38)%, 表明本方法回收率良好。

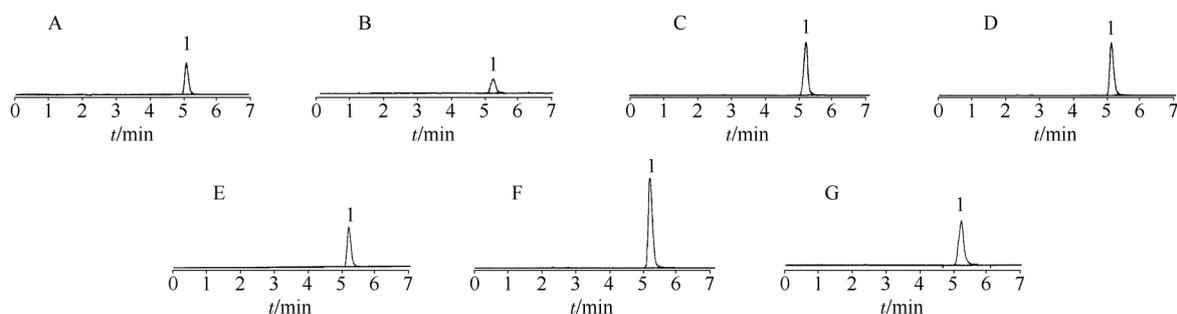


图1 专属性考察结果

A-对照品溶液; B-250 mg 参比制剂; C-250 mg 参比制剂加对照品溶液; D-500 mg 参比制剂; E-500 mg 参比制剂加对照品溶液; F-250 mg 参比制剂检测样品; G-500 mg 参比制剂检测样品; 1-盐酸二甲双胍。

Fig. 1 Results of specificity test

A-standard metformin; B-250 mg reference preparation; C-250 mg reference preparation spiked with standard metformin; D-500 mg reference preparation; E-500 mg reference preparation spiked with standard metformin; F-test sample of 250 mg reference preparation; G-test sample of 500 mg reference preparation; 1-metformin hydrochlorid.

表1 回收率试验结果

Tab. 1 Results of recovery test

规格/mg	浓度水平/%	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%
25	5.13	5.13	5.32	103.8	102.9±2.11
			5.36	104.5	
			5.14	100.3	
	10.25	10.25	9.99	97.5	
			10.11	98.6	
			10.15	99.0	
100	20.50	20.50	20.19	98.5	100.9±2.43
			20.93	102.1	
			20.95	102.2	
	14.42	14.42	14.15	98.1	
			14.32	99.3	
			14.38	99.7	
180	18.02	18.02	18.27	101.4	102.0±1.97
			18.28	101.4	
			18.56	103.0	
	21.63	21.63	21.71	100.4	
			22.19	102.6	
			21.93	101.4	

3.1.4 仪器精密度试验 分别取 500 mg 规格的参比制剂水介质溶出液 100%, 50%, 25% 3 个浓度的各 1 份, 按“2.2”项下自“精密吸取 50 μL 续滤液”开始, 每个浓度各制备 6 份供试液, 高、中、低 3 个浓度的 RSD 分别为 0.95%, 1.40%, 2.01%, 表明仪器精密度良好。

3.1.5 稳定性考察 称取 500 mg 规格的参比制剂研细粉适量, 分别以水、0.1 mol·L⁻¹ 盐酸、pH 4.0 及 pH 6.8 磷酸盐缓冲溶液 4 种溶出介质溶解。每周测定 3 d, 共测定 3 周。检测当日按“2.2”项下

自“精密吸取 50 μL 续滤液”开始, 制备供试液, 分别进行峰面积测定。4 种溶出介质中的 RSD 分别为 4.36%, 3.16%, 3.00% 及 3.04%, 表明盐酸二甲双胍分别在 4 种溶出介质中放置 21 d 稳定。

3.2 不同介质溶出曲线测定和对比结果

3.2.1 溶出介质的配制^[7] 水: 纯化水;

0.1 mol·L⁻¹ 盐酸: 精密量取浓盐酸 9.0 mL, 加水稀释至 1 000 mL, 摇匀, 即得; pH 4.0、pH 6.8 磷酸缓冲液: 精密量取盐酸 6.75 mL 溶于 750 mL 水中, 另精密称取 17.9 g Na₂HPO₄·12H₂O 溶于 250 mL 水, 混合上述 2 种溶液, 用 2 mol·L⁻¹ 氢氧化钠调节 pH 值至 4.0, 6.8。

3.2.2 不同介质溶出曲线的测定 取 2 个规格的试验制剂与参比制剂, 照中国药典溶出度与释放度测定法(通则 0931 第二法), 测定 4 种不同溶出介质中的溶出曲线^[5], 结果见图 2~3。转速 75 r·min⁻¹, 于 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 45, 60, 75, 90 min 按“2.2”项下方法自“取溶液约 1 mL”开始得供试液, 另取“3.1.2”项下各浓度对照品溶液, 分别按“2.1”项下色谱条件进样。以供试液峰面积代入由对照品溶液浓度及相应峰面积得到的回归方程, 计算各时间点的溶出量, 并采用相似性 f₂ 因子法评价。按试验制剂与参比制剂相同取样点且溶出量>85%的时间点≤1 个的原则选取时间点^[7], 计算公式如下:

$$f_2 = 50 \log \left\{ \frac{100}{1 + \frac{\sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2}{n}} \right\}$$

R_i 为 t 时间参比样品的平均溶出量; T_i 为 t 时

间受试样品的平均溶出量; n 为取样时间点的个数。

250 mg 试验制剂与参比制剂溶出曲线比较结果显示, 在 pH 4.0 磷酸盐缓冲液的溶出介质中, f_2 值为 41.0(<50), 溶出曲线相似度低; 在水、0.1 mol·L⁻¹ 盐酸及 pH 6.8 磷酸盐缓冲液的溶出介质中, f_2 值分别为 70.1, 55.8, 69.3(>50), 两者的溶出曲线相似度高。因两者于 4 种溶出介质中 15 min 内的平均溶出量均>85%, 认为两者溶出行为一致^[7]。

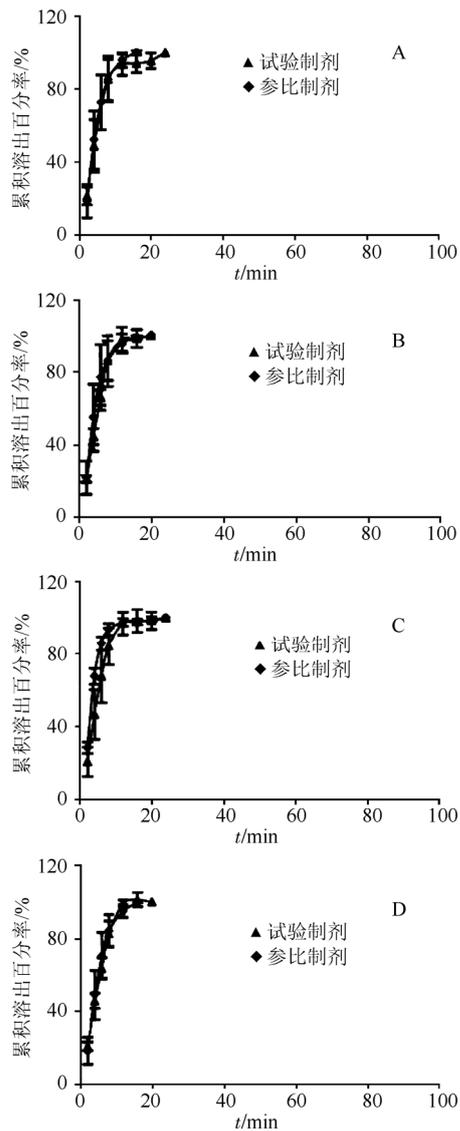


图 2 250 mg 试验制剂与参比制剂在不同介质中的溶出曲线对比

A-水; B-0.1 mol·L⁻¹ 盐酸; C-pH 4.0 磷酸盐缓冲溶液; D-pH 6.8 磷酸盐缓冲溶液。

Fig. 2 Comparison of release curve of test preparation and reference preparation in different dissolution media(250 mg) A-water; B-0.1 mol·L⁻¹ hydrochloric acid; C-pH 4.0 phosphate buffer; D-pH 6.8 phosphate buffer.

500 mg 试验制剂与参比制剂溶出曲线比较结果显示, 在 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶出介质中, 两者的溶出曲线相似, f_2 值为 78.5(>50); 在水、pH 4.0 及 pH 6.8 磷酸盐缓冲液的溶出介质中, 2 种制剂的溶出曲线不相似, f_2 值为 31.6, 39.5, 27.9(<50)。

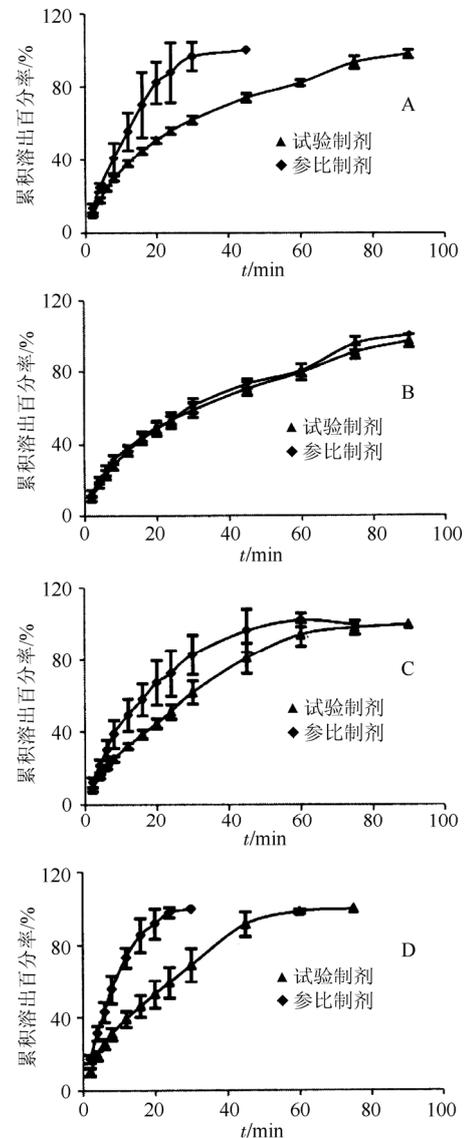


图 3 500 mg 试验制剂与参比制剂在不同介质中的溶出曲线对比

A-水; B-0.1 mol·L⁻¹ 盐酸; C-pH 4.0 磷酸盐缓冲溶液; D-pH 6.8 磷酸盐缓冲溶液。

Fig. 3 Comparison of release curve of test preparation and reference preparation in different dissolution media(500 mg) A-water; B-0.1 mol·L⁻¹ hydrochloric acid; C-pH 4.0 phosphate buffer; D-pH 6.8 phosphate buffer.

4 讨论

盐酸二甲双胍的检测参考中国药典 2015 年版第二部, 盐酸二甲双胍肠溶胶囊含量测定项下的检测及供试液配制方法, 采用 HPLC-UV^[6]。经专

属性、线性关系、精密度、稳定性、加样回收率考察,均满足本次溶出度考察的要求。与UV检测法相比^[8],HPLC-UV先分离后检测,具有更好的抗干扰性,适用于本次试验的4种制剂。且HPLC-UV溶出介质取样量少(≤ 1 mL,UV为5 mL),对溶出体系的稳定性影响较小。虽HPLC-UV的检测时间相对较长(1个样品运行时间为7 min),但稳定性考察结果显示,各pH条件下的供试液在3周内表现稳定。所有样品采集后,于1周内完成检测,保证了检测结果的可靠性。

溶出试验开始之前,对篮法/浆法、转速、取样时间点进行了摸索。最后采用更近似人体生理状态的浆法,同时兼顾各种制剂不同的溶出行为,以及同种制剂在各种pH条件下不同的溶出速度,最终采用 $75\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,于2,4,6,8,12,16,20,24,30,45,60,75,90 min各时间点采样。

250 mg的试验制剂及参比制剂在不同pH条件下均表现出快速溶出的行为,即15 min内容出量 $>85\%$,两者溶出行为一致性好;而500 mg的参比制剂(原研药厂欧盟上市)在不同pH条件下,表现出随pH升高溶出速度加快的行为。500 mg的试验制剂在 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸中与参比制剂有极好的溶出相似度,而随着溶出介质pH的上升,相似度降低。

国内自20世纪初开始对盐酸二甲双胍片进行仿制,大多都以中美上海施贵宝制药有限公司生产的500 mg格华止[®]作为参比制剂^[9-10]。格华止[®]在各pH的溶出介质中溶出行为一致,在4种溶出介质中15~20 min的累积溶出率均 $>85\%$,与日本新药株式会社的250 mg Glycoran[®]相似,均属于快速溶出。而近期国家药品监督管理局于发布的《仿制药品参比制剂目录》,500 mg的参比制剂为Merck Santé S.A.S的Glucophage[®],其溶出行为与500 mg的格华止[®]完全不同。Glucophage[®]在不同pH的溶出介质中溶出速度不同,只有在pH 6.8磷酸缓冲液中15 min内的累积溶出率达到85%。

从本次试验结果可以看出,500 mg的试验制剂在 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸、pH 4.0及pH 6.8磷酸缓冲液各pH的溶出介质中也呈现出了溶出速度相

应提高的现象,但只有 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸的溶出曲线与参比制剂一致,而且,于pH 4.0及pH 6.8磷酸缓冲液的溶出介质中各时间点的累积溶出率均小于参比制剂。可见,对随pH条件变化、溶出行为相应变化制剂的仿制水平有限。

盐酸二甲双胍为BCSIII分类的药物^[11],具有高溶解、低渗透特性,吸收速度受渗透性影响。250 mg的试验制剂与参比制剂均为快速溶出,按《人体生物等效性试验豁免指导原则》可以获得豁免;而500 mg的参比制剂仅在pH 6.8磷酸缓冲液的溶出介质中表现为快速溶出,因此不能豁免,最终试验制剂与参比制剂在疗效上是否一致还需要通过生物等效性试验进行验证。

REFERENCES

- [1] MEN P, GU X C, ZHAI S D. A consistency evaluation based on Chinese literatures for generic metformin hydrochloride [J]. Clin Med J(临床药物治疗杂志), 2016, 14(4): 30-34.
- [2] 国家食品药品监督管理局. 普通口服固体制剂参比制剂选择和确定指导原则[EB/OL]. [2016-03-18]. <http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL1751/147583.html>.
- [3] 国家食品药品监督管理局. 仿制药参比制剂目录(第五批)[EB/OL]. [2017-06-08]. <http://www.sdaqh.gov.cn/html/2017614/n804920247.html>.
- [4] SHI Y F, TANG Y N, FU X W, et al. Study on consistency evaluation of the dissolution of generic and original preparations of fenofibrate tablet [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(2): 148-151.
- [5] 中国药典. 四部[S]. 2015: 121-124.
- [6] 中国药典. 二部[S]. 2015: 859-862.
- [7] 国家食品药品监督管理局. 普通口服固体制剂溶出曲线测定与比较指导原则[EB/OL]. [2016-03-18]. <http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL1751/147583.html>.
- [8] 祝德秋, 崔岚. 国产与进口二甲双胍片溶出度的比较[J]. 医药导报, 2005, 24(6): 520-521.
- [9] WANG S H, HUANG B, ZHANG H H, et al. Evaluation of metformin hydrochloride tablets by dissolution curves in different media [J]. Pharm Clin Res(药学与临床研究), 2016, 24(1): 26-28.
- [10] MA J G. Dissolution contrast between domestic and imported metformin hydrochloride tablets [J]. J Pract Med Tech(实用医技杂志), 2014, 21(10): 1053-1055.
- [11] 国家食品药品监督管理局. 人体生物等效性试验豁免指导原则[EB/OL]. [2016-04-8]. <http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL1757/149640.html>.

收稿日期: 2019-04-08

(本文责编: 李艳芳)